



# KOREAN PATENT ABSTRACTS(KR)

Document Code:A

(11) Publication No.1020030005593 (43) Publication.Date. 20030123

(21) Application No.1020010040955 (22) Application Date. 20010709

(51) IPC Code:

C12N 9/02

(71) Applicant:

JAKWANG CO., LTD.

(72) Inventor:

SEO, CHAN SEOK

SEO, SANG BONG

YOO, HYANG JA

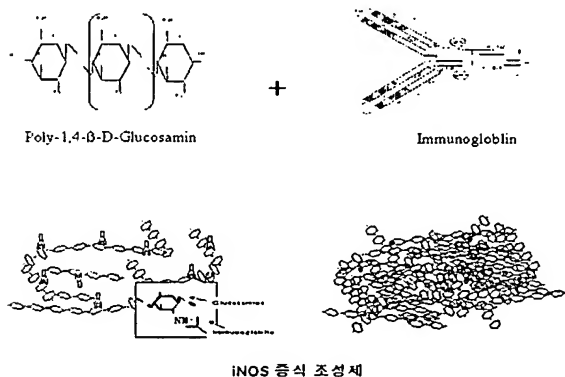
(30) Priority:

(54) Title of Invention

PREPARATION OF A COMPOSITION STIMULATING iNOS ENZYME INDUCING  
IMMUNO-REACTANT NITRIC-OXIDE SYNTHESIS

Representative drawing

(57) Abstract:



PURPOSE: Provided is a preparation of a composition stimulating iNOS enzyme which induces immuno-reactant Nitric-Oxide Synthesis to improve enteric function and to remove cholesterol.

CONSTITUTION: The method for producing the immunological growth adjuvant of an immune inducible nitric oxide(NO) synthase iNOS comprises the steps of: (1) adjusting pH of water-soluble chitin/chitosan in a 10 to 40% salt solution to pH 4.5 to 8.5, and treating the solution with the ultrasonic wave; (2) digesting the solution of the step (1) with lysozyme, and subjecting the solution to ion-exchange; (3) subjecting the first ion exchanged fraction to ion-exchange again in order to prepare water-soluble β-glucosamine fiber; and (4) coating water-soluble β-glucosamine fiber

with 0.1 to 15% of immune protein.

© KIPO 2003

if display of image is failed, press (F5)

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N 9/02	(11) 공개번호 (43) 공개일자	특2003-0005593 2003년01월23일
(21) 출원번호	10-2001-0040955	
(22) 출원일자	2001년07월09일	
(71) 출원인	주식회사 자광	
(72) 발명자	경기 안성시 신소현동 138 유항자 경기도안성시금산동 11-53통 1번 서상봉 경기도안성시금산동 11-53통 1번 서찬석 경기도안성시당왕동 534대우아파트 104-401	
(74) 대리인	허상훈	

심사청구 : 있음

(54) 면역 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제 및 이의 제조방법

요약

본 발명은 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑) 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 천연생체고분자 소재인 키틴/키토산을 소금(NaCl) 용액상에서 초음파분해처리, 라이소자임(Lysozyme)으로 분해처리, 이온교환 처리하여 수용성 β-글루코사민 섬유소를 제조한 후 면역단백질을 나노 코팅 및 결합함으로써 기존의 키토산 개념과 차별화되는 기능적 요소를 함유하는 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도

도 1

색인어

면역발현성 NO 생성효소 iNOS, β-글루코사민, 면역단백질

명세서

도면의 간단한 설명

- 도 1은 본 발명에 따른 iNOS 증식 조성제를 나타낸 것이다.
- 도 2는 수용성 키토산과 비수용성 키토산의 FT-IR 그래프를 비교한 것이다.
- 도 3은 N<sup>6</sup>MMA에 의한 NO의 생성을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 iNOS 발현량을 웨스턴 블랏(western blot)으로 분석한 것이다.
- 도 5는 TNF-α 발현량을 웨스턴 블랏(western blot)으로 분석한 것이다.
- 도 6은 대식세포에서 본 발명에 따른 조성제에 의해 유도된 핵인자 kB의 활성도를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 조성제의 세포 재합성 및 친화성에 의한 창상치유 효과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 조성제의 각 조직에 대한 전이율을 나타낸 그래프이다.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 천연생체고분자 소재인 키틴/키토산을 소금(NaCl) 용액상에서 초음파분해처리, 라이소자임(Lysozyme)으로 분해처리, 에탄올을 세척, 이온교환 처리하여 수용성  $\beta$ -글루코사민 성유소를 제조한 후 면역단백질을 나노 코팅 및 결합함으로써 기존의 키토산 개념과 차별화되는 기능적 요소를 함유하는 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

성유소 및 천연 생체 소재는 본질적으로 동일한 식품성분들의 이중혼합물로 식물이나 동물에서 얻어지는 천연재료가 주성분인 구성 분자량이 10만 이상인 고분자물질로서 포유동물의 소화계 효소에 의해 가수분해되지 않는 성분으로 동식물세포군의 잔여물을 말한다. 성유소는 불용성과 수용성으로 크게 나누어지며 불용성에 비해 수용성은 가치가 더욱 큼에도 불구하고 그 수가 얼마되지 않아 그 중요성이 더하다.

성유소 중 식이성유의 역할은 소화관에서 변의 체류 시간을 단축시키고 양을 증가시키며 장의 활동을 원활하게 하며, 약리적으로는 면역력 강화, 콜레스테롤 저하, 심장질환 예방, 영양분의 체내 흡수 저지 작용이 있어 다이어트식 등에도 적극 이용되며 지방의 흡수 저해, 포도당의 흡수를 지연시켜 당뇨병에도 효능이 큰 것으로 알려지고 있으나, 천연소재로서 바이오 구성체의 특성을 갖는 기능성이 갖추어질 때 가치의 크기를 더할 수 있다. 대부분의 식이성유는 식물 자원 구성원이지만 글루코사민 성유소는 동물성 자원형 구성으로 그 구조가 셀룰로스와 약간의 차이점을 가지고 있다. 불용성 식이 성유소가 수용성화 처리된 것은 펙틴(pectin), 콜라겐, 일부 변성을 이위는 아직 소재가 없는 것으로 알려지고 있다. 하지만, 식품산업이나 의약산업에서 소재의 빈곤과 폭 넓은 이용성을 확보하기 위해서도 더구나 합성물질이 대부분을 차지하는 현대 사회에서 특히, 천연소재로서 정제와 집적도에 따라 약물 전달체 등과 같은 본 발명에서의 표적 세포에 투과성을 부여한 면역 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑)는 친수성  $\beta$ -글루코사민 식이성유 기질로서 고단위로 분리, 제조할 수 있으므로 전 산업의 활용도에서도 반가운 일이 아닐 수 없다.

특히, 키틴은 게, 새우 등의 갑각류 및 버섯의 균체 등 천연에서 산출되는 것으로서 1→4  $\beta$ -D 글루칸 혼합 결합체로서 식물의 셀룰로스와 유사한 구조를 갖는 분자량 100만 이상의 동물성 식이성유이다.

키토산은 화학효소 처리를 통해 키틴에서 탈아세틸화된 것으로, 천연에 존재하는 가장 풍부한 고분자 다당류이며 항암작용, 항균작용, 콜레스테롤 조절작용, 면역활성 증강작용, 혈압상승억제작용, 혈당조절작용 등과 같은 다양한 생리 가능성을 가지고 있는 바이오매스(biomass)이지만, 키토산의 용해성과 활성도 문제로 다양한 용도에 이용되지 못하고 유도체화 등의 사용과 제한적인 용도에만 사용되어왔다. 본 발명에 따른 면역발현 전달체는 자연소재, 고분자 소재가 빈약한 바이오 산업 및 미래에 활용 가치력을 더욱 크게 증가시킬 수 있는 장점을 가지고 있으며, 특히 천연소재인 키틴/키토산은 기능적 특성을 밝혀 잘 활용하기에 따라 무한 자원, 상생(相生)의 재료로 친환경적 요소를 가지고 있으나 반응성이 거의 없고 기술적 활용 및 수준이 매우 미천한 상태에의 부분 이용만을 하고 있다.

현재까지는 키틴/키토산 유래 면역발현 전달체는 개발된 것이 없고, 키토산 유도체로서 영산염 타입의 키토올리고당의 수용성 키토산화 저분자물을 저급한 수준에서만 일부 특징 없이 사용되고 있으나, 고급 정밀 제품으로의 활용 및 전개 기술이 거의 없어 유도체나 분해산물 형태로 적은 부분만 이용되고 있기 때문에 효용가치와 활용의 전개에 어려움과 단점이 많다.

식이성유의 결핍은 많은 질병의 원인이 되기 때문에 특히 현대 인류는 면역적 결핍 및 환경 변화에 의해 면역력 자체에 문제를 많이 가지고 있다. 그래서 효율성이 우수하며 자체 면역발현성을 갖는 식이성유라 하면 질병의 예방 및 치료에 필수적 도움을 줄 수 있을 것이다. 또한, 천연소재는 그 자체가 가지고 있는 특성의 발휘에 구조와 분자량의 변화가 거의 없이 능력을 발휘하게 작용되는 점이 부작용 및 독성 없이 인류 건강에 더욱 큰 가치를 부여하게 된다.

#### 발명이 이루고자하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 상기와 같은 점을 감안하여 키토산을 연구한 결과, 천연생체고분자 소재인 키틴/키토산을 소금(NaCl)용액상에서 초음파분해처리, 라이소자임(Lysozyme)으로 분해처리, 에탄올을 세척, 이온교환 처리하여 수용성  $\beta$ -글루코사민 성유소를 제조한 후 면역단백질을 나노 코팅 및 결합함으로써 기존의 키토산 개념과 차별화되는 기능적 요소를 함유하는 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제를 제조함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명은 키틴/키토산의 고유 특성을 가지면서 면역발현성을 갖는 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

#### 발명의 구성 및 작용

본 발명은 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제 및 이의 제조방법을 그 특징으로 한다.

이와 같은 본 발명을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 확실하게 키틴의 고유성질과 특성이 우수하게 발현하여 진가를 나타낼 수 있는 잇점을 가진

기초재료로서, 대식세포의 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑)에 관한 것으로, 천연 소재로서 식품 및 의약재료의 무한 가능성과 소재 빈곤으로 오는 산업의 발전 진도를 상승시키고 인류 건강에도 지대한 공헌을 할 수가 있으리라 사료된다.

면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑)는 소장, 대장으로 이동하면서 보수성, 이온 교환능력, 꿀 형성력, 흡착성, 감염부위 및 체내의 상처 등 문제발생 부분으로 진행 흡수 결합 등의 일반 물리적 특성과 일부 글루코사민이 가지는 특성을 기본적으로 발휘한다. 일상에서 바람직하지 못한 생활 습관 및 식이 습관은 만성적 조직 및 혈관의 광범위한 염증성 세포부위의 장차적 조직의 파괴를 유래한다. 이때, 특히 소장의 조직파괴는 질병의 감염에서 대단히 중요하게 생각된다. 일반적으로 소장에서는 아주 작은 분자량의 영양소만을 능동적으로 흡수하게 되어 있으나 파괴된 소장의 정맥조직을 통하는 병원성균, 미생물, 유해성 물질과, 내장기 이상 등으로 비롯한 대장에 머무는 세균 및 유해성 물질의 역류로 유해성 미생물, 병원균, 분자량이 매우 큰 고분자 물질의 침투 및 흡수가능성이 매우 높아진다. 소장을 통하여 이러한 경로로 유입된 물질은 대부분 정상적인 간장에서 100%에 가까운 해독 및 감염예방작용을 하게 된다. 그러나, 바람직하지 못한 생활 습관 및 식이 습관과 스트레스 환경오염 등의 각종 간기능 저하 요인에 의하여 기능 저하된 간장은 이러한 완벽한 영양대사, 해독 및 감염예방을 모두 할 수 없게 되어 질병의 발생가능성은 매우 높아지게 된다.

본 면역활성 조성제는 고분자 수용성 무코다당체 구성으로써 면역감염경로와 밀접한 연관성을 가진다.

첫째로, 소화기 계통을 통하는 감염경로인 위장, 소장, 대장에서 무코 다당류 특유의 보습보수성 작용기 활성화 상태의 점액질막을 형성하게 되며, 유해 미생물 또는 병원균의 점착과 유해미생물 또는 병원균의 세포막파괴 및 세포내용물의 용출을 유도하는 작용을 하여, 1차 감염성 미생물 및 병원균 파괴의 유해 미생물 및 병원균으로 대한 예방효과를 가진다. 둘째로, 병원균 및 유해성 물질의 감염 흡수경로를 독점적으로 선점하게 되며 감염경로를 장악하고 이를 통하여 체내에 흡수되어 혈관 및 각 조직의 면역세포, 특히 면역기작의 최전방에서 매우 중요한 면역작용을 하는 대식세포를 활성화하여 병원균 및 유해요소 제거에 커다란 기능을 하게 된다.

따라서, 건전한 생활과 신체상태를 유지하는 건강인의 질환예방과, 질병 및 질환상태인 사람의 자연면역 강화 작용과 2차감염 예방 및 질환치유의 보조적 역할이 뛰어난 대체의약 필수소재로서 가치를 지닌다.

특히, 세포들간에 시그널을 유도하는 생물학적 작용에 관여하므로 백혈구에서의 NO 생성력이 우수하여 건강과 관련된 여러 특이기능을 유감없이 발휘하는 등의 장점을 더욱 부각시킬 수 있다.

주 용도로는 대체의약재료, 생체재료, 바이오재료, 다이어트식, 기능성음료, 특수 영양식 및 기능성 보조식품, 식품첨가제, 의약품원료 및 첨가제, 서방제 및 치료제, 동물약제 및 생활용품, 화학공업, 화장품공업, 의약산업, 기타 산업전반 등에 매우 긴요하게 활용될 수 있으며 기존의 식이성유에서 부족한 기능적 특성을 충족시킬 수 있다. 특히, 화학적 처리로서만 가능했던 부분을 소금물(NaCl), 초음파, 물리적 처리도 겸하여 분획 이온처리 순으로 순결도와 결정도를 높이고 면역발현 전달성까지 갖춘 이 발명은 인체에도 매우 유용하게 작용되는 유용한 것으로서 제조에서도 후처리 특성 문제와 환경적 어려움을 극복하여 생명과학 및 바이오 산업화 소재로 중요한 천연 고분자 성유소 자원이 된다. 천연항암제 등 약물 전달 체계에서도 고분자 약물은 모세혈관의 투과성이 우수하면 물리적 성질과 혈관의 구조 및 조합으로 재료의 체내 분포를 조절할 수 있다. 본 발명에 따른 면역발현 전달체는 분자량(10만 ~ 100만)이 크면서도 미립자로서 자극, 확산, 침투, 삼투, 인지 등 체내 전환율이 뛰어나며 지속성, 세포 조절기능, 생체적합성과 친화성, 세포안정성, 세포 목표성까지 갖춘 우수한 신소재로서 앞으로의 많은 소재와의 결합 사용으로도 실질적인 가치를 부여할 수 있다.

본 발명은 이러한 가치를 증명시키기 위해 다음의 분석 및 평가를 행하였으며 단백질의 효율 유지와 제제화의 안정화를 위해 동결 건조하였으며, 순환 혈액의 체류성을 개선시키기 위한 입자의 크기와 전하의 조절을 하여 서방성 작용과 체내 흡수 및 투과율을 높인 재료로서 세포 안정성 및 세포 친화성을 가지고 있다. 본 재료의 생체 투과 및 침투의 과정은 친화력과 반발력을 적절히 응용하여 생을 인식함으로써 mRNA를 활성화하여 NO 생성효소인 iNOS를 발현촉진시키며, 활성기가 체내 수분과 상호 작용하여  $\text{NH}_3^-$ 로 수소결합 기능의 활성역할이 증대되며 약제로서는 고분자 운반체와 목표 세포 전달의 효율성을 정제와 집적, +, -의 전하 크기의 조절로 상호 작용을 조절할 수 있다.

iNOS 증식 조성제는 탄수화물 구조에서 활성기가 기능을 차별화시키는 것으로서 탄수화물 기능은 성장, 부착, 음세포작용(pinocytosis), 항원, 수정, 분화에 밀접한 관계가 있으며 특히, 본 발명인 면역발현 전달체는  $\beta$ -글루코사민 유래 친수성 성유소는 당아민알콜의 고분자량으로서 아미노기( $\text{NH}_2$ )를 80% 이상 갖고 있으므로, 단백질의 당화에 번역 후 변형(post-translation modification)의 하나로서 세포내 소기관에서 단백질의 최종구조와 기능을 결정하여 생물학적 역할을 수행할 수 있도록 하는 세포 활동성 및 기능의 차이가 여타 식이 성유에 비해 뛰어나며 당화 진행에 있어서도 고분자 수용성 재료는 반응진행여력이 훨씬 많으며 상호작용이 크고 강하기 때문에 짧은 고리보다도 그 기능성의 발현이 실험 결과 상당히 우수한 것으로 알려지고 있다. 나날이 증가되는 환경오염, 항생제 등의 약 남용으로 인류의 건강권 방어가 혼탁해지므로 가급적 천연재료로의 전환과 천연소재의 개발은 더욱 중요도를 더해 갈 것이므로 본 발명의 면역발현체 고분자 친수성 성유소는 천연 소재로서 기능이 뛰어나 식이 성유로서는 물론 의약 및 바이오 산업과 생명 과학 산업에 이바지할 수 있으므로 식품 및 첨가소재, 대체의약소재, 바이오 소재, 의약품첨가제로서도 우수한 원료로 필연적인 사용이 될 수 있다.

본 발명에 따른 면역 발현성 iNOS 증식 조성제의 제조방법은 다음과 같다.

본 발명은 수용성 키토산을 소금(NaCl) 10 ~ 45 % 용액상에서 pH 4.5 ~ 8.5 범위로 맞춘 후 1 ~ 14시간, 10 ~ 80 °C, 파장 10 ~ 80 KHz 초음파분해 처리시키고, 라이조자임(Lysozyme)으로 분해시키고, 충분히 에탄올로 세정화를 실시한 후 양이온교환처리하여 분획분리로 필요한 분자량의 분산집적효율이 1.1 ~ 1.90이 되도록 고순도 집적시킨 다음 투과여액을 다시 1회 이상 이온교환 처리한 후 활성기를 도입하여 수용성  $\beta$ -글루코사민 구성을 갖는 성유소로 제조하며, 여기에 콜린산 0.01 ~ 2% 제조용액에 콜

라겐 0.001 ~ 15%를 중간축매로 사용하여 면역단백질 0.01 ~ 15%를 나노 결합 및 코팅하고 상기 수용액을 냉동 건조하여 제조하고 이를 굴절계(RI detector) 및 식이 섬유소 함량을 분석( $\beta$ -glucosamin, 단백질), 평가하고 최종 제품화하며 본 발명에 따른 iNOS 증식 조성제는 당아민알콜의 기본체로서 구성되어, 아미노산 구성체가 기능적 작용을 주도하며 당 구조는 흡수를 돕는 작용과 아미노산 증식의 기초 역할을 하여 면역 증진에도 기여가 큰 것으로 연구 결과 나타났다.

또한, 본 발명에 따른 면역발현성 iNOS 증식 조성제는 고체 및 액상, 겔, 가공제로서 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 사용하여 정제, 산제, 과립, 캡슐제, 현탁액, 유화액 또는 비경구 투여용의 단위투여형 또는 수회 투여형 제제로 제형화하여 사용할 수 있으며, 천연 바이오제로서 약물 흡수촉진제와 미래 질병 예방 차원의 기능적 식품, 대체의약, 주사제, 치료제, 세포 정화·조절제, 약물 전달체, 약물 담체, 제약의 약효상승 및 증강제 등에 적극 이용할 길을 열어 의미가 크다고 사료된다.

상기 조성제의 유효투입량은 환자의 나이, 신체적 조건, 몸무게 등에 의해 다양화될 수 있지만, 일반적으로 1 내지 300 mg / kg (몸무게) / 1일 범위 내에서 투여하며 치사량은 3,000 mg/Kg이다. 그리고, 1일 유효투입량 범위 내에서 하루에 한번 또는 하루에 여러 번 나누어 투입한다.

이하, 본 발명은 실시예에 의거하여 더욱 상세하게 설명하겠는바, 본 발명이 다음 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### 실시예 : 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제의 제조

미국특허 제 5,730,876호를 기초로 제조한 수용성 키토산(평균분자량 구성 10만-50만) 1000 g을 소금(NaCl) 30 % 용액상에서 pH 6 ~ 7 범위로 맞춘 후 3 시간, 45 °C, 파장 50 KHz에서 초음파 분해처리시킨 후 라이소자임으로 분해시키고,  $\text{NH}_2$ 고리의 변화 및 변형의 저지 및 최소 안정화를 위하여 80 °C에서 2시간 지속 후 이온교환처리하였다. 이때, 양이온수지는 DIAION PK228[삼양사, 한국]을 분당 1,500 cc 투과되게 사용하였고, 음이온 수지는 Dupont 사(USA)의 것으로 분당 500 cc 투과되게 사용하였으며, 효소반응시의 미 반응 물질과 불순물, 잔여 이온들의 제거에 카본 필터를 사용하여 충실하게 분획분리로 필요한 분자량의 분산집적효율이 1.1 ~ 1.9이 되게 순수도와 집적도를 높였다. 수용액 상에서 음이온과 양이온의 이온들을 확인하여 본 바 해리이온이 없는 것을 알 수 있었다.

분리공정으로 분산을 집적시키며 효소처리 후의 잔여 효소제거 및 고분자의 분획을 하기 위해 분획분자량이 100만, 60만, 30만, 20만, 10만을 차례대로 분획 병행 및 반복 하였으며, 여과장치와 여과막(가로 × 세로: 200 mm × 300 mm의 평막)은 자체 제작하여 사용하고 목적 수율(yield)은 95%(±10%)의 70 ~ 99%의 순수 집적물을 얻었다.

투과여액을 다시 1회 이상 이온교환처리로 양이온( $\text{NH}_2$ )전하 정화와 음이온( $\text{Cl}^-$ )을 도입 기본 수용성  $\beta$ -글루코사민 섬유소화로 유리되게 하며, 여기에 콜린산 1% 제조용액에 콜라겐 10%를 중간축매로 사용하여 면역글로불린 10%를 나노 결합 및 코팅하고, 이 수용액을 상온증류, 예냉을 거쳐 냉동 건조하여 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제를 제조하였다[도 1].

iNOS 증식 조성제의 굴절계는 JASCO 모델 LC-1500[RI-1530/PU-1580, Japan]으로 각 분자량의 덱스트란(dextrane) 표준물질 대비로 분석하여 표준치와 유사할 때의 분획조건으로 반응을 정지시켰다.

#### 실험예 1

본 발명에 사용된 기초 구성재료인 키토산은  $1650\text{ cm}^{-1}$ 에서, 키토산은  $1540\text{ cm}^{-1}$ 에서의 피크(peak)로 확인이 가능하며, 상기 실시예에서 얻은 조성제는 아세틸기( $\text{CH}_3\text{C=O}$ )와 아미드기( $\text{NH}_2$ )결합의 상호 반발작용을 이용하여 불안정 반응기가 중류수( $\text{H}^+\text{OH}$ )와의 수소결합으로 수산기( $\text{OH}^-$ )와 아미드기( $\text{NH}_2$ )의  $\text{H}^+$ 기가 결합되는 수용성화를 확인하였다[도 2].

#### 실험예 2

상기 실시예에서 얻은 조성제 내의 수용성 식이섬유 함유비율 측정실험을 다음과 같이 실시하였다.

먼저, 검체를 건조(동결 또는 감압건조)하여 효소( $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -glucanase, protease, amyloglucosidase)로 처리한 후 에탄올로 침전시켜 셀라이트(celite)를 항량시킨 여과기에서 여과하여 단백질과 회분의 함량을 측정한 다음, 그 값을 빼서 총 식이 섬유의 양을 정량하는 방법[보건복지부, 식품공전 1997: AOAC official method, 16th, 1995: 유림문화사, 식품분석법, 1994]으로 다음 수학적 1과 수학적 2를 이용하여 식이섬유함량을 계산하였다.

$$\text{공시험값(B, mg)} = \text{공시험 평균잔사무게(mg)} \times \text{PB} \times \text{AB} \times 100$$

상기 수학식 1에서: PB는 공시험 단백질량(mg)을 나타내고: AB는 공시험 회분량(mg)을 나타낸다.

$$\text{식이섬유 함량(\%)} = \frac{\text{검체의 평균잔사 무게(mg)}}{\text{검체의 평균 무게(mg)}} \times P \times A \times B \times 100$$

상기 수학식 2에서: P는 단백질량(mg)을 나타내며: A는 회분량(mg)을 나타내고: B는 공시험값(mg)을 나타낸다.

상기 식이섬유함량 계산결과, 총 식이 섬유함량이 90 ~ 99.6% 이상, 수용성 식이섬유 함량이 80 ~ 90% 이상의 결과를 얻었고, 재결정으로 순도를 99%이상 상승시킬 수 있었다.

또한, 키토산의 탈아세틸화도를 PVS(Potassium polyvinylsulfate solution) 적정법[Maeda, M., H. Murakami, H. Ohta, and M. Tajima(1992) Biosci. Biotech.Biochem., 56, 427-431]으로 측정한 결과, 탈아세틸화도가 80%이상을 나타내었다.

### 실험예 3

상기 실시예에서 얻은 조성제에 따른 NO 생성을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

대식세포 RAW264.7(ATCC)는 RPMI-1640 배지[RPMI-1640(GibcoBRL 23400-021) 1.62%, 탄산수소나트륨 0.2%, 페니실린 및 스트렙토마이신 혼합 항생제 1%]에 소태반혈장(fetal bovine serum, GibcoBRL 26140-079, 이하 FBS)을 10% 첨가한 배양액을 사용하여 이산화탄소 배양기(5% 이산화탄소, 95% 상대습도, 37 °C, 이하 CO<sub>2</sub> 배양기) 내에서 배양하였다.

세포배양에서 산화질소의 생성은 마이크로플레이트 분석법(microplate assay)으로 측정하였으며, 대식세포 RAW264.7를 대상으로 NO의 안정한 산화 생성물인 질산이온(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)의 생성을 측정하였다. 델베코-수정-이글 배지[Dulbecco's Modified Eagle's medium, Gibco BRL, USA, 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신, 10% FBS, 6 g/L HEPES, 3.7 g/L 탄산수소나트륨]에서 배양한 대식세포 RAW264.7(3 × 10<sup>5</sup> cells/ml)에 여러 가지 대조군을 정하여 다양한 자극을 하였다. 배지 자체, rIFN-γ + 본 발명 조성제, rIFN-γ + 본 발명 조성제 + LPS 를 함께 자극하여 시간에 따른 질산이온(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)의 양을 측정하였다. 대식세포에 인터페론 감마를 10 U/ml 처리하여 6시간동안 배양 후 본 발명 조성제(1 µg/ml), LPS(10 µg/ml), 본 발명 조성제(1 µg/ml) + LPS(10 µg/ml)를 각각 처리하여 48시간동안 배양하여 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 생성을 유도하였다.

그런 다음, 배지를 원심분리(1000 rpm, 10 분)하여 얻은 상등액 100 µl에 그리스 시약[Griess reagent: 37.5 mM 설파닐릭 산(sulphanilic acid), 12.5 mM N-(1-나프틸)에틸렌디아민디하이드로클로라이드 [N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride], 6.5 mM 염산] 100 µl를 첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 0 ~ 50 µM의 농도별로 제조한 질산염을 사용하여 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 농도-흡광도 상관계수를 작성한 후 대식세포 RAW264.7에서 생성된 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 농도를 계산하였다. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 생성량은 다음 표 1에 나타내었다.

[표 1]

rIFN-γ	LPS(내독소)	조성제(1 µg/ml)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µ M)
-	-	+0h	< 5.0
+	-	+12h	43.6 ± 4.2
+	-	+24h	51.7 ± 3.4
+	-	+48h	50.9 ± 1.5
+	+	+24h	55.1 ± 3.2
주) - : 무첨가 + : 첨가			

[표 2]

TAXOL<sup>®</sup>의 산화질소 생성량

rIFN- $\gamma$	LPS(내독소)	TAXOL(10 $\mu$ g/ml)	NO( $\mu$ M)
+	-	+0h	< 4.0
+	-	+12h	30.5 $\pm$ 3.2
+	-	+24h	40.7 $\pm$ 2.4
+	-	+48h	40.8 $\pm$ 3.5
+	+	+24h	45.1 $\pm$ 1.2
주) - : 무첨가 + : 첨가			

상기 표 1 및 표 2에 나타난 바와 같이, 상기 실시예에서 얻은 조성제 1  $\mu$ g/ml에서 NO 56  $\mu$ g/ml이 생성되었으며, 대조구로서 사용한 항암제인 TAXOL<sup>®</sup> 10  $\mu$ g/ml에서 NO 46  $\mu$ g/ml이 생성되어 10배 이상의 큰 차이를 나타내었다.

상기 실시예에서 얻은 조성제의 관찰 실험과 동물투여실험 결과 면역체계에서 iNOS를 생성시키며, 궁극적으로 대식세포에서 산화질소(NO)를 생성시키는 것을 확인하였다. 더불어 자연치유세포(NK cell)를 증식시키고 TNF- $\alpha$  세포(종양괴사인자)의 활성을 증가시키는 것으로 밝혀지고, 분자량이 20만 이상 커질수록, 농도가 10  $\mu$ g/ml까지는 높을수록 NO의 생성이 많아졌으며, 또한 병원성 박테리아, 바이러스 등도 제어하며 자아가 아닌 암세포 등을 괴사시키는 종양괴사인자의 생성도 촉진시켰으며, NO의 생성에 의한 말초혈관의 확장 효과, 산화질소에 의한 혈관의 평활근이 이완됨으로써 심장에 가는 혈액의 양을 증가시켜서 협심증, 심근경색 등에 효과가 있어 간(幹)세포가 사멸되지 않는 것을 확인하였다(참고로 NO 생성량은 iNOS 효소의 생성량으로 측정하였다).

또한, 본 발명의 실험으로서 글루칸 재료는 체내의 Cl<sup>-</sup> 이온만을 흡수, 조절하는 것으로 알려져 왔으나, 본 발명의 소재로 사용된 재료의 경우는 NaCl을 조절하는 것이 경구 투여 후 약물 전이체계를 분석을 통하여 확인하였다.

상기 실시예에서 얻은 조성제는 인체면역 1차반응을 담당하는 대식세포를 활성화하여 다량의 NO를 발생시켰다. NO는 반응성이 높은 분자로서 병원균의 LPS(내독소)로 인한 자극으로 자연발생된다. 항암, 항바이러스, 항박테리아 활성이 뛰어나며 대식세포가 활성화되었을 때 NO 합성효소인 iNOS에 의하여 아르기닌 경로로 생성된다.

대식세포 RAW264.7에서 L-아르기닌에 의존한 경로를 수반하는 본 발명 조성제에 의해 유도되는 산화질소의 신호 메커니즘을 규명하기 위해서는 rIFN- $\gamma$ 와 NGMMA를 존재 하에 6시간동안 배양하였다. N<sup>6</sup>MMA는 산화질소생성기질인 아르기닌의 아날로그체이다. rIFN- $\gamma$ 와 상기 실시예에서 얻은 조성제에 의해 생성되는 NO는 N<sup>6</sup>MMA의 증가에 따라 점차 저해되었다[도 3]. 도 4에서 iNOS의 합성은 휴대 밀도계를 사용하여 대조구값을 기준으로 하였다.

anti-iNOS 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 4는 대식세포 RAW264.7의 iNOS 발현 단백질에서 rIFN- $\gamma$ 와 상기 실시예에서 얻은 조성제 의 처리효과를 보여주었다. 상기 조성제는 데이터에는 보이지 않지만 그 자체만으로도 iNOS 발현에 부분적으로 관여하며, 본 발명은 rIFN- $\gamma$  또는 LPS와 rIFN- $\gamma$ 의 시너지효과로 인하여 대식세포 RAW264.7에서 iNOS 발현이 증가하였다. 상기조성제로 유도되어 발현된 iNOS는 N<sup>6</sup>MMA(10 mM)에 의하여 줄어들었다.

#### 실형예 4

상기 실시예에서 얻은 조성제에 따른 TNF- $\alpha$  발현을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

대식세포 RAW264.7( $3 \times 10^5$  cells/well)를 RPMI-1640 배지 자체, rIFN- $\gamma$ , 본 발명 조성제, rIFN- $\gamma$ +LPS, rIFN- $\gamma$ + 본 발명 조성제 각각 대조구로 28시간동안 배양하였다. 상기 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 분비량은 ELISA법으로 405 nm 파장에서 분석하여 측정하였다. 분석에 들어가기 전에 Tween-20을 0.05% 포함하는 PBS(phosphate-buffered saline)를 몇 방울 떨어뜨려 세척하였다. 분석에 사용되는 모든 시료는 37 °C에서 2시간 동안 배양하였다. 재조합 murine TNF- $\alpha$ 는 희석시켜 이것을 기준으로 삼는다. 분석판(assay plate)을 ABTS(Azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 기질 수용액[biotylate murine TNF- $\alpha$ , avidine peroxide, 30% H2O2 함유]에 노출시켰다.



[표 3]

rINFN- $\gamma$	LPS(내독소)	조성제( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )	TNF- $\alpha$ (ng/ml)
-	-	+	$0.81 \pm 0.02$
+	-	-	$0.76 \pm 0.02$
+	-	+	$1.34 \pm 0.09$
+	+	-	$2.80 \pm 0.20$
+	+	+	$2.92 \pm 0.11$

주) - : 무첨가, + : 첨가

도 5와 상기 표 3에서 보는 바와 같이, 대식세포 RAW264.7를 RPMI-1640 배지에서 조성제 자체로만 28시간동안 배양하면 적은 양의 TNF- $\alpha$ 가 발현되고, rINFN- $\gamma$ 와 상기 조성제로 함께 처리하면 많은 양의 TNF- $\alpha$ 가 발현됨을 확인하였다.

#### 실험예 5

상기 실시예에서 얻은 조성제에 따른 NF-kB 활성을 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

대식세포 RAW264.7( $5 \times 10^6$  cell/well)는 rINFN- $\gamma$ 와 6시간동안 배양한 다음 12시간동안 상기 조성제와 LPS로 자극시켰다. 모든 세포 용출(lysate)은 대식세포 RAW264.7를 샘플 완충용액[62.5 mM Tris-CL, pH 6.8, 2% 소듐 도데실 설페이트(SDS), 20% 글리세롤, 10% 2-머캅토에탄올]으로 끓였다. 세포에서 용출된 단백질들은 10% SDS-PAGE에 의해 분리하고, 니트로셀룰로즈 종이로 옮겼다. 이 막은 10%의 탈지유를 함유한 PBS-tween-20으로 실온에서 1시간동안 블로킹(blocking)하였다. 그런 다음 anti-iNOS, TNF- $\alpha$ 와 NF-kB(핵인자 카바-B) 항체들과 함께 배양하였다.

NF-kB 활성은 웨스턴 블랏에 의해 측정하였다. 도 6의 A)를 보면 rINFN- $\gamma$ 로 처리된 후 LPS로 자극된 대식세포에서 NF-kB(p65, p50) 합성단백질이 증가하는 것을 알 수 있었다. 상기 실시예에서 얻은 조성제는 그 자체만으로 NF-kB 합성단백질의 생성에 부분적으로 관여하지만, 재조합 rINFN- $\gamma$ 와 함께 자극했을 때 NF-kB 활성이 상승하는 것을 알 수 있었다. 또한, 대식세포 RAW264.7에서 rINFN- $\gamma$ 에 의해 유도되는 NF-kB 활성에서 상기 조성제의 효과는 EMSA(Electrophoretic mobility shift assay)로 확인하였으며, 대식세포 RAW264.7를 각각 배지 자체, rINFN- $\gamma$  + LPS, rINFN- $\gamma$  + 본 발명 조성제의 처리하여 배양하고 각각에서 핵추출을 하며, NF-kB 결합 부위를 함유하는  $^{32}\text{P}$ 로 표지된 올리고 뉴클레오타이드와 함께 배양하였다. 특이적인 NF-kB 결합력은 lane에서 검출 수 있고, rINFN- $\gamma$ 와 조성제를 같이 처리하면 DNA 결합력은 증가하였다[도 6의 B)].

#### 실험예 6

상기 실시예에서 얻은 조성제에 대한 항산화제로서의 유용성을 확보하기 위하여 대표적 항산화제인 비타민 C를 대조구로 산화방지력을 UV 차단값으로 비유 환산 다음 표 3과 같이 나타내었다. 사용기기는 UV흡광기(Cary, UV-visible Spectrometer)[Virian Co., USA]로 528 nm의 상온에서 측정하였다.

[표 4]

구 분	상기 얻은 조성제의 %별 용액			
	0.1%	0.5%	1%	2%
비타민 C	21.23%	28.51%	47.83%	58.28%
조성제	16.24%	24.25%	32.51%	54.45%

상기 표 4에 나타난 바와 같이, 비타민 C의 UV 값은 대표적 산화방지력 기준치로 사용되는바, 상기 조성제 역시 비타민 C와 유사한 UV 차단력을 나타내는 항산화력을 갖춘 결과를 가짐으로써 상기 조성제는 항산화제로 유용성을 가졌다.

#### 실험예 7

상기 실시예에서 얻은 조성제 분자량 300,000, 500,000, 750,000 및 1,000,000 의 4종으로 세포독성, 정막 및 혈관계 독성, 피부일차자극성을 알아보았다.

(1) 상기 조성제의 세포독성(cytotoxicity)을 일반적으로 많이 쓰이는 MTT 분석과 뉴트럴 레드 업테이크 어세이(Neutral Red uptake assay)로 시험한 결과 분자량의 크기에 관계없이

피부성유아세포(fibroblast)와 각질형성세포(keratinocyte)에서 모두 높은 세포생존율(cell viability)을 나타내어 세포에 대한 독성이 거의 없었다.

(2) 상기 조성제의 점막 및 혈관계 독성에 대한 HET-CAM 분석 결과, 분자량에 관계없이 1.0% 수용액까지 출혈, 세포용해, 응고 등의 독성반응이 전혀 관찰되지 않았다.

(3) 피부일차자극성을 24시간 철폘시험(patch test)으로 알아본 결과, 키토산 1.0% 수용액에서 분자량의 크기에 관계없이 평균피부반응도(mean score)가 0.63 ~ 1.25로서 자극이 없는 것으로 나타났다. 평균피부반응도는 한 예로서 기존 화장품에 주로 사용되는 유기합성방부제(P-M.Germal)를 사용한 제품과, 상기 조성제를 사용한 경우를 20명의 20대 여성을 대상으로 실제 피부 접촉시켜 상대적 비교 백분율한 것을 수치로 비교하는 것으로 상기 조성제는 실제 평균피부반응도가 40 ~ 50% 가량 적었으며 이는 자연 구성재로서 피부자극에 문제가 적다는 것을 나타내는 것이다. 상기 조성제의 분말을 그대로 적용한 부위에서는 자극반응이 전혀 관찰되지 않았다.

(4) 상기 조성제의 항미생물 활성과 항산화 활성을 여지원판(paper disk)법으로 실험한 결과 화장품 부문 이용에서의 천연재로서 보존력이 매우 뛰어났다.

## 실험예 8

상기 실시예에서 얻은 조성제 0.001 ~ 0.1%의 용액과 파우더로 마우스 50 ~ 55g 짜리 암수 구별없이 20마리씩을 3회 반복 시험을 대한약전 기준으로 급성 독성시험, 피내반응 시험, 발열성 시험, 용혈성 시험, 조직이식시험을 하였다. 그 결과 정한 규격기준에 적합하였고, 주사액으로 제조 생리식염수 대조군로 하여 주사 후 발열, 즉사 등을 확인한 바 이상이 없었고, 세포독성시험에서도 아무런 이상을 나타내지 않은 무독한 재료임을 확인하였으며, 사람의 혈액에 위 시험액을 첨가하여 확인한 바 백혈구의 수와 형태변형이 없었고, 백혈구의 이물질 침입의 응집상이 관찰되지 않았으며 혈소판, 적혈구 수의 증감 현상이 없어 혈액 적합성이 우수한 것으로 판단되었다. 시험기기는 Cell dyn 900<sup>TM</sup> [Dupont사, USA]과 노아바우어 챔버(Neubauer Chamber) 및 광학현미경을 사용 측정하였다.

## 실험예 9

상기 실시예에서 얻은 조성제의 분자량에 따른 생물·화학적 활성특성을 조사하였다.

원소분석, 베일그테린법(Beilstein test), ESCA 등의 무기분석과 <sup>13</sup>C NMR, <sup>1</sup>H NMR, FT-IR 등의 유기물 분석으로 확인하였고, 농약으로의 생물학적 활성을 검색하고자 국내외적으로 문제가 심각한 3가지 병원균인 토마토역병균(*Phytophthora infestans*), 밀붉은녹병균(*Puccinia recondita*), 보리흰가루병균(*Erysiphe graminis* f. sp. hordei)에 대하여 상기 조성제 1000, 250, 50, 10, 2 ppm의 농도에서 *in vivo*로 스크리닝한 결과 농도가 높을수록 항균활성이 증가되었고, 밀붉은녹병에 선택적으로 높은 활성을 나타냈다.

토마토 하우스 재배에서 실제 발생된 흰가루병(*Erysiphe cichoracearum*, *leveillula taurica*, Powdery mildew)에 0.001 ~ 3%까지의 수용액을 제조하여 뿌리 근처의 흙에 10 cc 정도를 48시간 간격으로 3 ~ 7회 간격으로 주어진 실험을 하여본 바 3회 이상에서부터 이 병후가 없어지는 것을 확인하였다.

## 실험예 10

본 발명 조성제	0.1 g
락토스	0.7 g
결정성 셀룰로오스	0.15 g
마그네슘 스테아레이트	0.05 g
총 량	1 g

상기에서 나열된 성분들을 잘게 부쇄 혼합한 후 직단법(direct tableting method)에 의해 정제를 제조하였다. 각 정제의 총량은 100 mg이고, 그 중 유효성분의 함량은 1 mg이다.

## 실험예 11

본 발명 조성제	0.1 g
옥수수 전분	0.5 g
카르복시 셀룰로오스	0.4 g
총 량	1 g

상기에 나열된 성분들을 잘게 부쇄 혼합하여 분말을 제조하였다. 경질 캡슐에 분말 100 mg을 넣어 캡슐제를 제조하였다.

## 실험예 12

상기 실험에 10 및 11에서 제조한 조성제의 정제, 캡슐을 동물실험에 적용한 결과, Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 일주일동안 표준사료로 적응시킨 후 대조군은 고지방식이를 급여하고 실험군은 발명 조성제를 5% 혼합하여 대조군과 실험군으로 나누어 4주간 자유급식방식으로 사육한 후 단두하여 혈액채취하여 조사하였다. 상기 랫드 300 ~ 320 g 짜리 20마리, 투여횟수 1일 1회, 투여량 1일 2.5 mg, 투여기간 28일 후부터 측정된 바 총 콜레스테롤 함량을 15 ~ 30%, 혈당을 15 ~ 25% 감소시켰고, 배변량을 25 ~ 30% 증가시켰으며, 저분자물에 비해 5배 정도가 큰 것으로 확인하였다. 본 발명은 비만과 변비방지, 콜레스테롤 제거 등 성인병 예방 효과가 서방성으로 인한 지속적 분해 차이점을 보였으며 약물 흡수를 돕는 작용이 크고 알콜 분해 능력이 저분자형인 올리고당에 비해 5%이상 우수하게 나타났다. 미래 질병의 예방차원의 천연재료로서 확실한 면역, 의학, 영양적 기능가치가 우수함을 알게되었다.

#### 실험에 13

본 발명에 따른 조성제는 기본 조성물인 글루코사민의 생체 친화성 및 세포 무독성으로 인하여 세포에 적용하였을 때 효과가 높다. 이에 본 발명 조성제의 대식세포활성기능 이외에 세포재생력을 조사하기 하기 위하여 창상치유력을 실험하였다. 상기 조성제를 동결건조하여 디스크형태로 제작하고 쥐에게 창상모델을 유도하였다. 상기 조성제 자체의 창상치 유력 및 세포재생효과를 위한 실험군과 세포유착 단백질로서 창상치유가 높은 피브로넥틴(Fibronectin) 및 이를 변형시킨 재조합 단백질과 함께 처리하였다. 실험 결과, 조성제를 창상부위에 도포하였을 때 서서히 녹으면서 얇은 막으로 형성하였으며 점성만으로도 창상치유 및 빠른 재생효과와 세포재생을 나타내었다. 창상치유제와 함께 사용한 경우에는 매일 교환할 필요없이 3일에 한번 교환하여도 훨씬 뛰어난 효과를 나타내었으며, 그 자체의 디스크형태만 직접 사용된 경우도 효과가 뛰어났고, 복합 사용된 경우에도 창상치유제의 양을 현저히 줄일 수 있었다. 도 7에서 보여지듯이, 상기 조성제와 그것의 구성 재료는 세포 친화성을 가진 세포 재생제로서 이용가능하며 다른 약물과 함께 사용시 서방성 효과도 가지고 있어 뛰어난 상승효과를 발휘할 수 있는 세포친화성 재료로서 활용을 확인하였다[도 7].

#### 실험에 14

상기 실시예에서 얻은 조성제의 1% 수용액으로 세균(bacteria), 진균(funge)에 접종하여 군수 증식을 살펴본바 있으며 접종량은 세균  $3.77 \times 10^6$  cfu/g, 진균  $1.2 \times 10^5$  cfu/g하여 대조군(무접종)와 비교하였다. 접종 후 7일부터 28일까지 그 수의 증가가 없었으며 병원성균은 0 cfu/g로 불검출되어 자체 방부력과 위생력도 갖추었음을 확인하였다.

#### 실험에 15

섭취한 식품 중의 영양소가 얼마나 소화, 흡수되는가를 수치를 소화흡수율 또는 체내전이용률로 표시한다. 이는 이미 널리 알려진 출납실험으로 분변에 대한 질소(단백질), 탄수화물, 지방질, 회분, 무기질 등을 분석하는 방법이나 경구로 본 시료를 투입한 바 혈장 내에서 모체는 검출이 되지 않았으나 완전한 흡수로 보기에는 어려운 점이 체내의 효소에 의해 잘려진 후 전이, 전화, 흡수되었는가 위로 가기 전에 지질과 결합하여 배설되기 때문인 것으로 사료된다.

소화흡수율은 동물에 따라 식품분석에서 얻은 각 영양소가 얼마나 유효성있게 이용되는지를 측정하는 것이므로 영양소의 소화흡수율은 음식물의 배합비율이나 조리 등의 요소에도 변화하지만 이것을 먹는 측정체의 건강상태, 노동량, 음식물 섭취량에도 영향을 받는다. 소화흡수율은 다음 수학적 3 및 수학적 4로 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{겉보기소화흡수율} &= \frac{\text{흡수 성분량}}{\text{섭취식품 중의 성분량}} \times 100 \\ &= \frac{\text{섭취식품중의 성분량} - \text{분변 중의 배설성분량}}{\text{섭취식품 중의 성분량}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\text{합소화흡수율} = \frac{\text{섭취식품 중의 성분량} - (\text{분변 중의 배설량} - \text{내인성 손실량})}{\text{섭취식품 중의 성분량}} \times 100$$

그 결과, 상기 조성제의 소화흡수율은 일반 수용성 식이성유와 비슷한 정도인 20 ~ 40% 이상으로 나타났으며, 상기 조성제의 전이용률을 알아보기 위하여 200 g 내외의 정상쥐를 24시간 공복시킨 후 꼬리 정맥을 통해 2.5 mg/ml의 형광물(FITC, Fluorescein isothiocyanate)-조성제 결합물을 주사하고 각각 1시간, 8시간, 24시간이 되는 시점에서 동물을 마취시켜 혈액과 조직을 채취하여 검출량을 측정한 결과, 혈관 전이도 98.1%를 나타내었다[도 8].

실험예 16

서방성은 효력의 지속성을 나타내는 것으로, 분자량 20,000 이하의 저분자물을 비롯하여 분자량 1,000,000까지의 상기 실시예에서 얻은 조성제를 7일 간격으로 동물(닭과 마우스 각 20마리 3회)의 생산 능력, 면역력 등 활성을 1일 0.1% 사료에 첨가한 실험군과 기존 먹이만 준 대조구와 동일조건에서 비교하여 다음 표 5와 같이 나타났으며 실제 닭 사육농장(경기도 평택시 소재 강남농장)에서의 사육 사양관리자들은 한우닭에서도 활력이 생기는 것을 일반 비교 관찰로 알 수 있었으며 위 재료로 구성된 재료를 보조적으로 사용하여도 실제 사양비가 여러 부분에서 절감되었고, 또한 얻어진 계란에서 난백의 경도와 난황의 색도가 일반 사양에서 얻어진 것이 6 ~ 7° 인데 착색제를 사용하지 않았지만 12 ~ 14° 로 뚜렷해짐을 발견하였다.

[표 5]

구 분	대조구	AMW 20,000이하	AMW 100,000	AMW 200,000	AMW 300,000	AMW 600,000	AMW 1,000,000
닭(성계) 의 활력	0	발견안됨	2 ~ 4일	3 ~ 5일	4 ~ 5일	4 ~ 5일	5 ~ 6일
마우스의 활력	0	관찰안됨	6 ~ 7일	7일	7 ~ 8일	8 ~ 10일	8 ~ 10일

또한, 양돈사육 농가[경기도 용인 형제농장]의 경구투여실험을 하였고, 이곳은 실제 구제역(Picornaviridae Aphthovirus, Food and mouth disease) 발생지역으로 계속 70 kg중 돼지 20마리 돈사에 아직 감염증상이 보이지 않은 상태에서 상기 조성제 200 mg 정제를 만들어 1일 3회 투여하였고, 3% 이하 수용액을 제조하여 수시로 음수와 사료에 투여한 바 돼지군에서 그 질환의 특징적 요소가 발현, 진행되지 않았다. 이는 면역체계의 기본 완성과 아포토시스(Apoptosis) 및 바이러스 제어율, 유전자 변형방지, 대사장애방지에도 관여하고 있다는 것을 간접 확인하였다.

실시예 17: iNOS 증식 조성제 함유 음료 조성물

정제수 75.5 g을 60 °C로 가온하고 상기 실시예에서 얻은 조성제 2 g, 붕말 3 g, L-타이신 염산염 0.001 g, 비타민 B1 0.002 g, 비타민 B2 0.01 g, 니코틴산 아마이드 0.01 g, 구연산 0.2 g, 과당 15 g, 판토텐산 칼슘 0.01 g, 비타민 B6 0.003 g, 패각 추출물 2.4 g을 첨가하여 교반하여 용해시켰다. 250, 500, 1000 ml 단위로 병에 충전한 후, 90 °C이하에서 20분간 살균하였다.

발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑)는 장기능 개선은 물론 비만이나 콜레스테롤 제거뿐만 아니라 뛰어난 기능성 작용도 할 수 있으며, 기존의 성유소와 달리 미백색으로 식품첨가에 선택의 폭을 증가시킬 수 있고, 한방 재료로도 제 기능과 수송전달 역할을 충분히 할 수 있다. 또한, 본 발명은 현대사회의 고지방식과 동물성 식사로 인한 고단백 식사 및 변이식품, 농약, 환경호르몬, 각종 오염물, 각종 인위 합성 화학물질의 많은 사용에서 오는 유전자 변이적 질환, 내분비계의 혼란 정보로 오는 질병의 대처 방안과 미래질병의 예방 차원의 소재가 될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

- 1) 수용성 키틴/키토산을 소금(NaCl) 10 ~ 40 % 용액상에서 pH 4.5 ~ 8.5 로 조정한 후, 상기 용액을 초음파 분해 처리시키는 단계;
- 2) 상기 1) 단계의 용액을 라이소자임(Lysozyme)으로 분해시키고 이온교환 처리하여 고순도 집적시키는 단계;
- 3) 상기 2) 단계의 여액을 다시 이온교환 처리하여 수용성 β-글루코사민 성유소를 제조하는 단계; 및
- 4) 상기 3) 단계의 성유소에 면역단백질 0.1 ~ 15 %로 나노 결합 및 코팅하여 냉동 건조시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑)의 제조방법.

## 청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 1) 단계 초음파 분해처리는 1 ~ 14시간, 10 ~ 80 ℃, 파장 10 ~ 80 KHz에서 실시하는 것을 특징으로 하는 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑)의 제조방법.

## 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 2) 단계 이온교환 처리는 양이온과 음이온의 교차처리이며, 고순도 집적은 분산 집적효율이 1.1 ~ 1.9 인 것을 특징으로 하는 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑)의 제조방법.

## 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 4) 단계 면역단백질의 나노 결합 및 코팅 시 콜라겐 및 콜린산을 중간 촉매로 사용하는 것을 특징으로 하는 iNOS 증식 조성제(造成劑)의 제조방법.

## 청구항 5

청구항 1의 제조방법에 의해 제조된 것으로, 분자량이 10만 ~ 100만인 것을 특징으로 하는 면역발현성 NO 생성효소 iNOS 증식 조성제(造成劑).

## 청구항 6

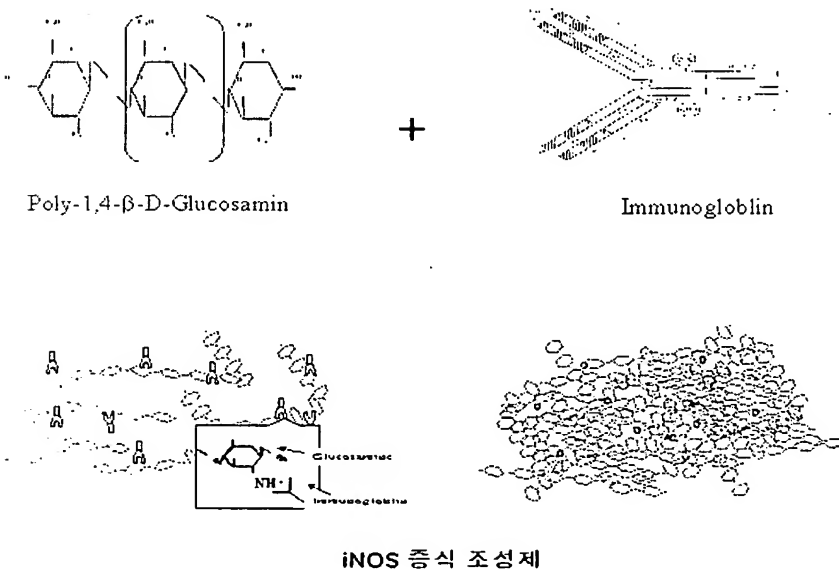
청구항 1의 제조방법으로 얻은 조성제(造成劑)를 함유하는 것을 특징으로 하는 약제 조성물.

## 청구항 7

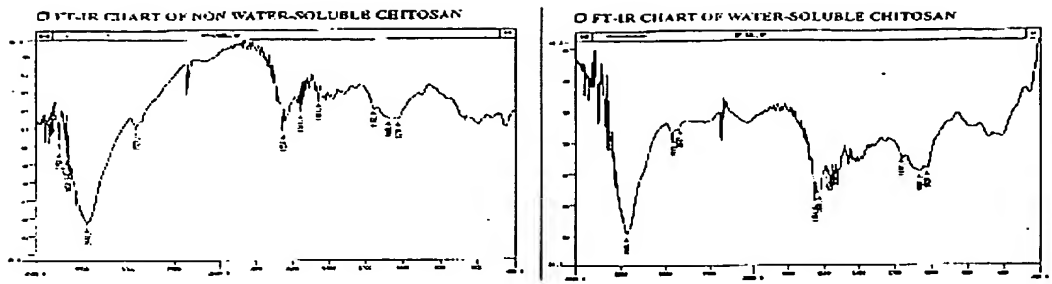
청구항 1의 조성제를 함유하는 것을 특징으로 하는 식품첨가제.

## 도면

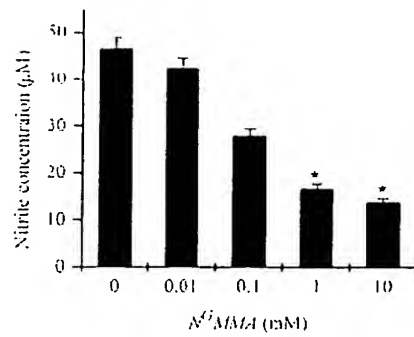
도면1



도면2



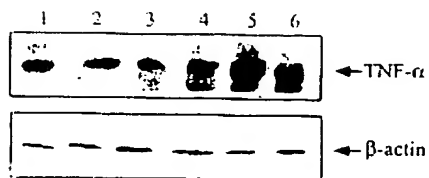
도면3



도면4

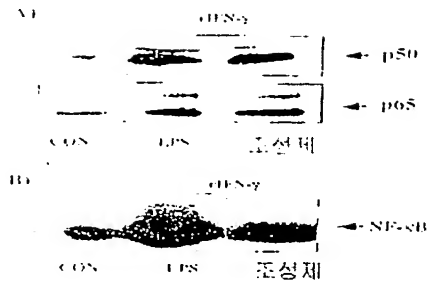


도면5



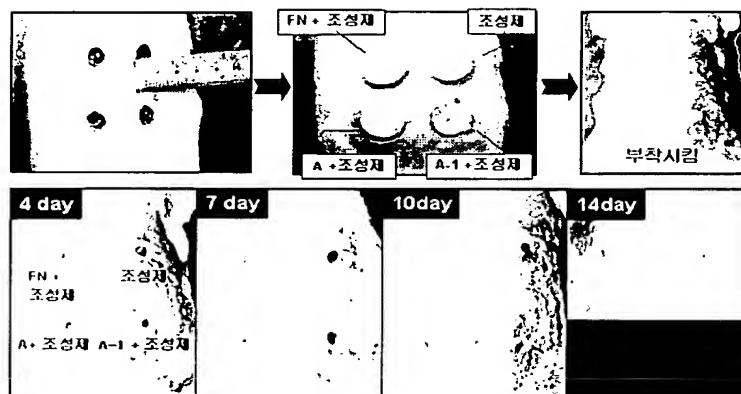
1. Control 2. 인터페론감마 3. LPS 4. 발명조성제 4. 인터페론 +LPS 5. 인터페론감마 +발명조성제

도면6



- A) 핵인자-κB 활성화에 관여하는 단백질  
B) 핵인자-κB 활성량의 Western Blot

도면7



\* A, 재조합단백질

BEST AVAILABLE COPY

도면8

